

بررسی فون جونندگان (Muridae: Gerbillinae) و تعیین مخازن بیماری لیشمانیوز

پوستی با روش Nested-PCR در شهرستان جاسک، استان هرمزگان، ۱۳۸۷

کوروش عزیزی^۱، بهروز داوری^۲، محسن کلانتری^۳، سجاد فکری^۴

۱- دانشیار، گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان و مرکز تحقیقات علوم بهداشتی،

دانشکده بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران (مؤلف مسؤول) تلفن: ۴-۷۲۵۱۰۰۱-۰۷۱۱-azizik@sums.ac.ir

۲- استادیار، گروه قارچ و انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۳- کارشناس ارشد گروه قارچ و انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

۴- کارشناس مبارزه با بیماریها، مرکز بهداشت شهرستان جاسک، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، جاسک، ایران

چکیده

زمینه و هدف: جونندگان دم جارویی (Rodentia: Muridae: Gerbillinae) مهمترین میزبانان مخزن انگل عامل بیماری لیشمانیوز جلدی مرطوب (Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis=ZCL) یعنی *Leishmania major* می باشند. در مناطق مختلف کشور گونه های متفاوتی از این جونندگان در نگهداری انگل نقش دارند. از آنجا که شهرستان جاسک در حال حاضر مهمترین کانون اندمیک این بیماری در استان هرمزگان و جنوب شرقی کشور محسوب می گردد، مطالعه حاضر بمنظور آگاهی از گونه های جونندگان این شهرستان و تعیین گونه های مخزن انگل طراحی و اجرا گردید.

روش بررسی: در مطالعه ای توصیفی در سال ۱۳۸۷، جونندگان از مناطق مختلف شهرستان با استفاده از تله های زنده گیر صید گردیدند. این جونندگان در فیلد با استفاده از کلروفورم بیهوش و از لاله گوش هر حیوان چهار عدد لام بروش سمباده زنی تهیه و سپس مشخصات مرفومتریکی آنها بطور کامل اندازه گیری و ثبت گردید. شکم هر جونده با تیغ جراحی باز و کبد و طحال هر نمونه در تیوبهای شماره گذاری شده حاوی اتانول ۷۰ درصد نگهداری و بقیه بدن نیز پس از پاکسازی در بطریهای حاوی فرمالین ده درصد جهت تاکسیدرمی و تعیین هویت به آزمایشگاه جانورشناسی ارسال گردید. لامهای تهیه شده هم به روش میکروسکوپی (رنگ آمیزی با گیمسا) و هم مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند. کبد و طحال هر نمونه مورد استخراج DNA و تکثیر آن قرار گرفتند. استخراج DNA بروش Proteinase K و فنل/کلروفورم/آیزوآمیل الکل انجام و تکثیر آنهم به روش Nested-PCR و با استفاده از پرایمرهای LIN R4-Lin17-LIN19 که بطور اختصاصی بخش متغیر (Variable) مینی سیر کلهای کیتوپلاست گونه های مختلف انگلهای لیشمانیا را تکثیر می نمایند، انجام پذیرفت. این پرایمرها قادر به تشخیص و تمایز میان گونه های لیشمانیای موجود در کشور بودند.

یافته ها: در مجموع ۱۰۶ سر جونده صید گردید که از پنج گونه از سه جنس مختلف بودند. گونه *Meriones persicus* با ۲۷/۳۵ درصد صید گونه غالب بود. آلودگی لیشمانیایی بطریقه میکروسکوپی در یک نمونه ماده گونه *Tatera indica* (۳/۷٪)، یک نمونه ماده گونه *Meriones hurrianae* (۳/۸۵٪) و یک نمونه نر گونه *Gerbillus nanus* (۵/۸۸٪) مشاهده گردید. در روش مولکولی نیز یک مورد آلودگی در گونه *T. indica*، دو مورد آلودگی در دو نمونه ماده *M. hurrianae* (۷/۶۹٪) و دو مورد آلودگی در نمونه های نر و ماده ای از *G. nanus* (۱۱/۷۶٪) مشاهده و گونه انگل *L. major* شناسایی گردید.

نتیجه گیری: جونندگان دم جارویی به وفور و با تنوع نسبتاً زیاد در شهرستان جاسک و در مجاورت اماکن انسانی فعالیت می نمایند. گونه های *G. nanus* و *M. hurrianae*، *T. indica* بعنوان میزبانان مخزن بیماری در این کانون معرفی می شوند. این مطالعه اولین مطالعه مولکولی مخازن بیماری لیشمانیوز در جنوب شرقی کشور می باشد. آلودگی گونه ژریلوس نانوس به لیشمانیا ماژور برای اولین بار در دنیا گزارش می گردد.

کلید واژه ها: لیشمانیوز پوستی، جونندگان دم جارویی، Nested-PCR، لیشمانیا ماژور، تاترا ایندیکا، ژریلوس نانوس، مریونس هوریانه، جاسک، ایران.

وصول مقاله: ۸۹/۱۰/۴ اصلاحیه نهایی: ۸۹/۱۲/۸ پذیرش مقاله: ۹۰/۱/۱۷

دارد. جایکه پشه خاکی *Phlebotomus papatasi* ناقل اصلی و قطعی آن بوده و گونه‌های مختلف جوندگان دم جارویی زیر خانواده Gerbillinae (Rodentia: Muridae) بعنوان میزبانان مخزن (Reservoir Hosts) عمل می‌نمایند (۸). در آسیای مرکزی ژربیل بزرگ (*Rhombomys opimus*) و در شمال آفریقا و خاورمیانه *Psammomys obesus* میزبانان مخزن اصلی انگل هستند (۲). در ایران نیز تاکنون گونه‌های متعددی از این جانوران بعنوان مخازن بیماری گزارش گردیده‌اند. میزبان مخزن اصلی در ایران گونه *R. opimus* می‌باشد که در نواحی مرکزی، شمال و شمالشرق کشور و نیز در جنوب تهران آلوده پیدا شده است (۹-۱۱ و ۵). جرد لیبی *Meriones libycus* مخزن مهم بعدی است که تقریباً در تمام مناطقی که رومبومیس/اوپیموس مخزن اصلی است، نقش مخزن ثانویه را داشته (۱۲) و علاوه بر آن در کانونهایی مثل ارسنجان، نیریز و مرودشت استان فارس (۱۳-۱۵) و نیز دامغان و اردستان بعنوان میزبان اصلی معرفی شده است (۱۶ و ۱۷). در مناطق غرب و جنوب غربی کشور گونه ژربیل هندی *Tatera indica* مخزن اولیه و گونه‌های *Nesokia indica* و *M. libycus* مخازن ثانویه هستند (۱۸). گونه *T. indica* در خرامه فارس نیز بعنوان میزبان اصلی گزارش شده است (۱۹). در جنوب شرقی کشور گونه جرد بیابانی هندی یا *Meriones hurrianae* مخزن اصلی و *T. indica* مخزن ثانویه است (۲۰). اخیراً در شهرستان لارستان فارس *T. indica* نیز دو گونه جونده از جنس Gerbillus s.l. بعنوان میزبانان مخزن بیماری گزارش شده ولی این جوندگان در حد گونه شناسایی نشده‌اند (۲۱). علاوه بر این گونه انگل، اخیراً انگل *Leishmania turanica* نیز از جونده *Nesokia indica* در استان کرمانشاه شناسایی

جوندگان (Order Rodentia) بزرگترین راسته پستانداران هستند که با جمعیتی بیش از کل جمعیت سایر پستانداران بر روی کره زمین منشأ خسارات اقتصادی و بهداشتی فراوانی می‌باشند (۱). یکی از مهمترین معضلات بهداشتی این جانوران نقش آنها بعنوان میزبان مخزن بیماریهای ژئونوز می‌باشد و یکی از مهمترین این بیماریها بیماری لیشمانیوز جلدی یا سالک است (۲). لیشمانیوز به مجموعه بیماریهایی اطلاق می‌شود که بوسیله گونه‌های پاتوژن انسانی از جنس *Leishmania* spp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) ایجاد شده و با بروز سالیانه دو میلیون نفر در دنیا از نظر سازمان جهانی بهداشت (WHO) جزء هشت بیماری مهم مناطق گرمسیری است (۳). تاکنون ۲۱ گونه از این انگل بعنوان پاتوژن انسانی شناخته شده‌اند (۴). از بین چهار فرم اصلی لیشمانیوز دو نوع لیشمانیوز پوستی یا سالک و لیشمانیوز احشایی یا کالا آزار در ایران وجود دارد (۵). لیشمانیوز پوستی خود به دو فرم شهری یا خشک با عامل اتیولوژیک *Leishmania tropica* و مرطوب یا روستایی با عامل *Le. major* دیده می‌شود (۶). بطور کلی بیماری سالک در چند دهه اخیر همواره در کشور در حال گسترش حوزه جغرافیایی خود بوده و در حال حاضر این بیماری در ۱۵ استان کشور بصورت اندمیک وجود داشته و در سایر مناطق نیز بصورت اسپورادیک وجود دارد. تعداد موارد سالیانه ثبت شده بیماری در ایران ۲۰-۳۰ هزار نفر بوده و بروز سالیانه آن حدود ۲۸ در هر یکصد هزار نفر جمعیت در معرض خطر است (۷).

لیشمانیوز جلدی مرطوب در مناطق خشک و نیمه خشک شمال آفریقا، خاورمیانه و آسیای مرکزی شیوع

گونه‌های جهندگان مخزن بیماری میسر نیست، مطالعه حاضر بمنظور شناسایی فون جهندگان این شهرستان و تعیین میزبانان مخزن بیماری سالک اجرا گردید.

روش بررسی

مطالعه حاضر مطالعه‌ای توصیفی (Descriptive) بود که در شهرستان جاسک واقع در منتهی الیه شرقی استان هرمزگان انجام شد. این شهرستان با مختصات جغرافیایی (۵۸°، ۲۶' - ۲۴°، ۲۴' عرض شمالی و ۱۱°، ۵۷' - ۱۵°، ۵۹' طول شرقی از نصف النهار گرینویچ) در ساحل شمالی دریای عمان قرار داشته و دارای آب و هوایی گرم و مرطوب است.

صید جهندگان در فصول بهار، پاییز و زمستان سال ۱۳۸۶ در روستاهای انتخابی شهرستان که از مناطق مختلف اقلیمی شهرستان انتخاب شده بودند انجام گردید. به این صورت که ماهیانه یکبار و هر بار ۱۰ تله زنده‌گیر Sherman در هنگام غروب آفتاب در اطراف لانه‌های فعال نصب و صبح روز بعد جمع‌آوری می‌گردیدند. از خرما، خیار سبز و گردو بعنوان طعمه استفاده می‌گردید. پس از جمع‌آوری، تله‌های حاوی جهنده درون یک کیسه نایلونی قرار داده شده و با پنبه آغشته به کلروفرم بیهوش می‌شدند. سپس کلیه مشخصات مرفومتريک جهنده اندازه‌گیری و ثبت و شماره‌گذاری شده و به روش سمباده زنی از سروزیه هر گوش آن دو عدد لام تهیه می‌گردید (۳۰). پس از اطمینان از مرگ حیوان با استفاده از تیغ جراحی استریل، شکم جهنده باز و کبد و طحال آن در ظرف در پیچدار شماره‌گذاری شده حاوی اتانول ۷۰٪ قرار داده شده و خود جهنده نیز پس از پاکسازی شکم در ظرف حاوی فرمالین ۱۰٪ جهت تاکسیدرمی و تعیین هویت به

شده است. هر چند این گونه پاتوژن انسانی نیست ولی همزمانی آن با *Le. major* ممکن است در بیماریزایی این گونه تأثیر مثبت بگذارد (۲۲).

در تمام این مناطق پشه خاکی فلیوتوموس پاپاتاسی ناقل اصلی و قطعی بیماری به انسان بوده است (۲۵-۲۳ و ۱۱ و ۵). البته بجز این گونه، پشه خاکیهای دیگری نیز بعنوان ناقل انگل در بین جهندگان در مناطق روستایی کشور گزارش شده‌اند از جمله *P. (Para) alexandri*، *P. (Para) caucasicus andrejevi* و *P. (Synphlebotomus) ansarii moghulensis* و *P. (P.) salehi* (۲۶ و ۲۳ و ۵).

روشهای مولکولی مبتنی بر PCR سالهاست که با سهولت و بطور روتین در آزمایشگاههای معتبر دنیا و نیز بوسیله محققین داخلی برای شناسایی انگل در بدن ناقلین و مخازن بیماری لیشمانیوز با موفقیت استفاده می‌شوند (۲۸ و ۲۷ و ۲۵ و ۱۵ و ۱۴). این روشها با حساسیت و اختصاصیت بالا قادر به تشخیص تعداد کم انگل بوده و از منابع مختلف DNA مثل هسته، کیتوپلاست، ریوزوم و غیره استفاده می‌نمایند (۲۹ و ۲۷).

شهرستان جاسک در شرق استان هرمزگان و در مجاورت استان سیستان و بلوچستان در چند سال اخیر شاهد افزایش تدریجی تعداد موارد بیماری بوده بطوریکه تعداد موارد در سال ۱۳۸۵، ۲۲۳ مورد و در سال ۱۳۸۶ به ۲۴۵ مورد رسید (آمار مرکز بهداشت استان هرمزگان، منتشر نشده). از آنجا که با توجه به وضعیت توپوگرافیک استان و پراکندگی پیوسته مخازن بیماری در دشتهای ساحلی استان احتمال گسترش بیماری به سایر مناطق استان به شدت مطرح بوده و طرحریزی یک استراتژی کنترلی بدون اطلاع از

بصورت Overnight در انکوباتور 37°C قرار داده می‌شد. سپس $300\ \mu\text{l}$ محلول فنل/کلروفرم/ایزوآمیل الکل اضافه و 10 دقیقه در دور $10000\ \text{rpm}$ سانتریفیوژ می‌شد. پس از جداسازی فاز حاوی DNA، به نسبت $1:10$ استات سدیم و دو تا سه برابر حجم محلول حاوی DNA، اتانول 100 درصد سرد اضافه و مجدداً بمدت 6 دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس با خارج نمودن الکل، DNA رسوب داده شده پس از خشک نمودن و اضافه نمودن میزان لازم بافر TE تا زمان PCR در یخچال 4°C نگهداری می‌گردید.

برای تکثیر ناحیه متغیر (Variable) مینی سیر کلهای DNA کیتوپلاست انگل لیثمانیا (minicircle kDNA) از تکنیک Nested-PCR استفاده گردید. در این تکنیک از پرایمرهای LINR4 بعنوان فوروارد در هر دو مرحله، پرایمر LIN17 بعنوان Reverse مرحله اول و پرایمر LIN19 بعنوان پرایمر Reverse مرحله دوم استفاده گردید. توالی پرایمرها بصورت زیر بود.

-LIN R4: 5'- GGG GTT GGT GTA AAA TAG GG-3'

-LIN 17: 5'- TTT GAA CGG GAT TTC TG-3'

-LIN 19: 5'- CAG AAC GCC CCT ACC CG-3'

این تکنیک توسط Aransay و همکاران در سال

2000 طراحی شده و بوسیله نگارنده در مطالعات متعددی برای تشخیص انگل لیثمانیا در بدن ناقلین و مخازن لیثمانیوز مورد استفاده قرار گرفته بود (26 و 28). حجم مواد مورد نیاز و پروفایل حرارتی دو مرحله بصورت زیر بود.

$250\ \mu\text{M}$ of each dNTPs, $1.5\ \text{mM}$ MgCl_2 , $1\ \text{U}$ *Taq* Polymerase (Cinagene, Tehran), $1\ \mu\text{M}$ primer LINR4, $1\ \mu\text{M}$ primer LIN 17, $5\ \mu\text{l}$ of DNA extract in 1X PCR buffer (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany).

آزمایشگاه جانورشناسی دانشگاه شیراز ارسال می‌گردید. تشخیص جوندگان در آزمایشگاه جانورشناسی موزه تاریخ طبیعی دانشگاه شیراز و با کمک کلید تشخیصی جوندگان ایران (۱) انجام و نمونه‌های مشکوک جهت تأیید به مرکز تحقیقات جونده شناسی دانشگاه مشهد ارسال می‌شد.

لامهای تهیه شده از گوش و قاعده دم موشها به روش میکروسکوپیک و رنگ آمیزی گیمسا مورد بررسی بمنظور مشاهده آماستیگوت‌های انگل قرار گرفتند. در صورت مشاهده جسم لیثمن، لامهای مثبت وارد پروسه استخراج DNA می‌شدند. استخراج DNA از لامهای حاوی اجسام لیثمن بروش معتضدیان و همکاران انجام شد (31). به اینصورت که سطح لامها با تیغ بیستوری استریل تراشیده و مواد حاصله به یک میکروتیوب اپندورف انتقال داده شده و با اضافه نمودن Lysis Buffer و Proteinase K و متعاقباً محلول فنل/کلروفرم/ایزوآمیل الکل از آنها استخراج DNA صورت می‌گرفت. همچنین گاهی بدون تراشیدن سطح لام که معمولاً باعث از دست رفتن مقدار زیادی از مواد روی لام می‌شد، مستقیماً مقداری Lysis Buffer به محتویات روی لام اضافه شده و پس از چند دقیقه نگهداری در حرارت اطاق با استفاده از سمپلر محتویات روی لام به یک لوله اپندورف انتقال داده می‌شد. این عمل برای چند بار تکرار می‌شد تا محتویات روی لام بخوبی شسته شود. بقیه مراحل مثل قبل بود.

استخراج DNA از کبد و طحال نیز به روش عزیزى و همکاران انجام شد (25 و 28 و 32). به این ترتیب که تکه‌های کوچکی از این اندامها بریده شده و در لوله‌های اپندورف $1/5$ میلی‌لیتری له و هموژنایز می‌شد. سپس $200\ \mu\text{l}$ Lysis Buffer و $12\ \mu\text{l}$ پروتئیناز K اضافه و

Le. tropica: MCAN/IR/96/Lon49
Le. major: MHOM/IR/89/ARD2 و MHOM/IR/54/LV39
 جهت مقایسه استفاده گردید. این استرینها از گروه انگل و قارچ شناسی دانشکده پزشکی شیراز گرفته شده بود. برای کلیه واکنشها بمنظور اطمینان از صحت عملکرد از کنترل منفی که DNA استخراج شده از کبد جونندگان سالم بود استفاده می گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه در مجموع ۱۰۶ جونده صید گردید که از پنج گونه مختلف بودند. گونه *persicus* *Meriones* با ۲۹ درصد صید گونه غالب بود. در این مطالعه صید جونندگان صرفاً از خارج از اماکن و حاشیه روستاها انجام شد و در نتیجه هیچگونه موش خانگی (*Mus musculus*) که معمولاً در مطالعات تعیین فون جونندگان صید می‌شود، صید نگردید. گونه‌ها، تعداد و درصد صید جونندگان در مناطق تحت بررسی شهرستان جاسک در جدول ۱ آمده است.

این حجم مواد در هر دو مرحله یکسان بود فقط پرایمر Reverse در مرحله دوم تعویض شده و دو مایکرولیتر از محصول مرحله اول بعنوان Template DNA برای واکنش مرحله دوم استفاده می‌شد. در مرحله اول پس از یک حرارت اولیه 94°C بمدت ۵ دقیقه (Initial Denaturation)، تکثیر ادامه می‌یافت با 94°C (Denaturation)، ۳۰ ثانیه در 52°C (Annealing) و ۱ دقیقه در 72°C (Extension) و نهایتاً ۱۰ دقیقه حرارت 72°C (Final Extension) (مرحله اول در ۳۰ سیکل تکرار می‌شد). پروفایل حرارتی مرحله دوم نیز شبیه مرحله اول بود البته بدون حرارت اولیه و نیز درجه حرارت مرحله Annealing آن 58°C بود. مرحله دوم ۳۳ سیکل تکرار می‌شد.

پس از تکثیر DNA مورد نظر، میزان ۵ مایکرولیتر از محصول PCR پس از اختلاط با Loading Buffer بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید بمدت حدود ۴۰ دقیقه الکتروفورز شده و پس از آشکارسازی در دستگاه UV Transilluminator با مقایسه باندهای حاصله از نمونه‌های مورد بررسی با باندهای حاصل از استرینهای استاندارد مورد شناسایی قرار می‌گرفتند. از استرینهای استاندارد *Le. infantum*:

جدول ۱: تعداد و درصد صید جونندگان در روستاهای مورد مطالعه شهرستان جاسک، استان هرمزگان، ۸۷-۱۳۸۶

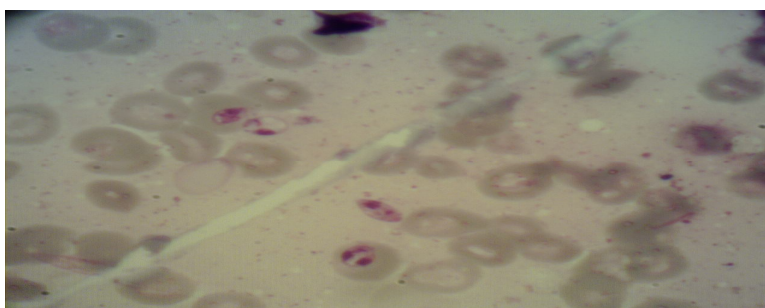
| درصد صید گونه به کل | کل صید گونه | | | غرب شهرستان (دشت) | | | مرکز شهرستان (کوهستانی) | شرق شهرستان (دشت) | | | گونه |
|---------------------|-------------|----|----|-------------------|-----|-------|-------------------------|-------------------|------|-------|---------------------------|
| | کل | ♀ | ♂ | جاسک کهنه | نگر | گنگان | گوا | لیردف | سورک | گوهرت | |
| ۲۷/۳۵ | ۲۹ | ۱۷ | ۱۲ | ۱۱ | ۸ | ۹ | ۰ | ۱ | ۰ | ۰ | <i>Meriones persicus</i> |
| ۲۵/۴۷ | ۲۷ | ۱۴ | ۱۳ | ۱۲ | ۸ | ۵ | ۲ | ۰ | ۰ | ۰ | <i>Tatera indica</i> |
| ۲۴/۵۲ | ۲۶ | ۱۲ | ۱۴ | ۰ | ۰ | ۲ | ۰ | ۱۱ | ۹ | ۴ | <i>Meriones hurrianae</i> |
| ۶/۶۰ | ۷ | ۲ | ۵ | ۰ | ۶ | ۱ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | <i>Meriones libicus</i> |
| ۱۶/۰۳ | ۱۷ | ۷ | ۱۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۸ | ۶ | ۳ | <i>Gerbillus nanus</i> |
| ۱۰۰ | ۱۰۶ | ۵۲ | ۵۴ | ۲۳ | ۲۲ | ۱۷ | ۲ | ۲۰ | ۱۵ | ۷ | کل صید |

کلیه نمونه‌های مربوط به گونه های تاترا ایندیکا و مریونس هوریانه از جنس ماده بود ولی در گونه ژریلوس نانوس در روش مولکولی یک مورد آلودگی در جنس نر و یک مورد هم در جنس ماده ملاحظه گردید (تصاویر ۱ و ۲).

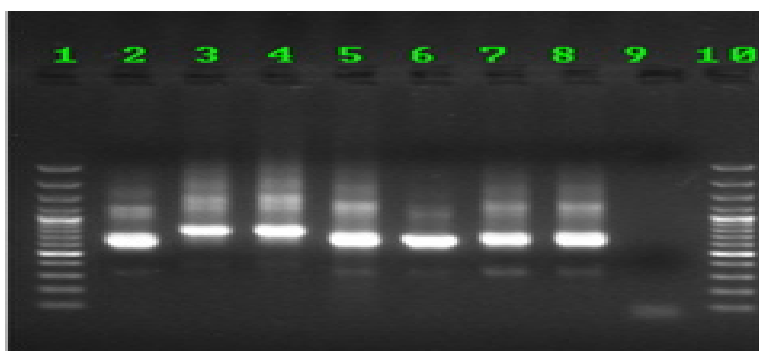
کلیه جوندگان صید شده مورد نمونه برداری بمنظور تشخیص آلودگی لیشمانیایی بروش میکروسکپیک و نیز مورد بررسی به منظور تشخیص DNA انگل لیشمانیا در کبد و طحالشان قرار گرفتند که نتایج مربوطه در جدول ۲ به تفکیک مشخص شده است. آلودگی تأیید شده در

جدول ۲: نتایج مربوط به شناسایی مخازن بیماری سالک، شهرستان جاسک، استان هرمزگان، ۸۷-۱۳۸۶

| گونه | تعداد صید | درصد صید به کل | تعداد آلوده | | درصد آلودگی در گونه | |
|---------------------------|-----------|----------------|-------------|---------|---------------------|-------|
| | | | میکروسکپی | PCR | میکروسکپی | PCR |
| <i>Meriones persicus</i> | ۲۹ | ۲۷/۳۵ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| <i>Tatera indica</i> | ۲۷ | ۲۵/۴۷ | ۱ (♀) | ۱ (♀) | ۳/۷۰ | ۳/۷۰ |
| <i>Meriones hurrianae</i> | ۲۶ | ۲۴/۵۲ | ۱ (♀) | ۲ (♀) | ۳/۸۵ | ۷/۶۹ |
| <i>Gerbillus nanus</i> | ۱۷ | ۱۶/۰۳ | ۱ (♂) | ۲ (♀,♂) | ۵/۸۸ | ۱۱/۷۶ |
| <i>Merones lybicus</i> | ۷ | ۶/۶۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| کل صید | ۱۰۶ | ۱۰۰ | ۳ | ۵ | ۲/۸۳ | ۴/۷۱ |



تصویر ۱: آماستیگوت لیشمانیا ماژور در نمونه تهیه شده از جوندۀ *Meriones hurrianae*، شهرستان جاسک، استان هرمزگان، ۱۳۸۷



تصویر ۲: نتیجه الکتروفورز محصولات Nested-PCR نمونه‌های جوندگان شهرستان جاسک، استان هرمزگان، ۱۳۸۷ با پرایمرهای LINR4، LIN17 و LIN19 در ژل آگاروز ۱/۱/۵٪. سایز مارکر (ستونهای ۱ و ۱۰)، استرین استاندارد لیشمانیا ماژور (۲)، استرین استاندارد لیشمانیا تروپیکا (۳)، استرین استاندارد لیشمانیا اینفاتوم (۴)، دو نمونه ژریلوس نانوس (ستونهای ۵ و ۶)، یک نمونه مریونس هوریانه (ستون ۷)، یک نمونه تاترا ایندیکا (ستون ۸)، و کنترل منفی (ستون ۹).

بحث و نتیجه گیری

شهرستان جاسک در جنوب شرقی کشور در سالهای اخیر شاهد افزایش ناگهانی بروز بیماری بوده و در تقسیم بندی اپیدمیولوژیک بیماری همراه با شهرستان بستک جزء استراتوم یک ($API > 1$) قرار گرفته بود. با توجه به شرایط اقلیمی مناسب استان هرمزگان بخصوص پیوستگی دشتهای ساحلی حاشیه شمالی خلیج فارس و دریای عمان و عادت مهاجرت جوندگان ژریلینه و احتمال گسترش بیماری بطرف غرب و شهرستان بندرعباس مطالعه حاضر بمنظور شناسایی مخازن بیماری در این کانون اجرا گردید.

در این مطالعه پنج گونه جونده ژریلینه بعنوان فون جوندگان دم جارویی شهرستان جاسک تعیین هویت گردیدند. از بین نمونههای صید شده گونههای *Meriones persicus* با ۲۷/۳۵ درصد، *Tatera indica* با ۲۴/۵۲ درصد، *Meriones hurrianae* با ۱۶/۰۳ درصد و *Gerbillus nanus* با ۶/۶ درصد صید به ترتیب فراوانترین گونههای صید شده بودند. از آنجا که نمونه گیری در حاشیه روستاها انجام شد، موش خانگی *Mus musculus* که در اکثر مطالعات تعیین فون جوندگان گزارش می گردد، صید نشد.

تاکنون مطالعات محدودی در ارتباط با فون جوندگان دم جارویی در استان هرمزگان انجام شده است. در مطالعه سلیمانی احمدی و همکاران، در منطقه کهورستان شهرستان بندرعباس فقط گونه *Rhombomys opimus* صید گردید (۳۳). نکته قابل توجه این است که در مطالعه حاضر گونه *R. opimus* که مخزن اصلی بیماری در اکثر مناطق مرکزی و شمال شرقی کشور است، صید نگردید. اگر چه قطعاً فون جانوری در شرایط جغرافیایی

مختلف ممکن است متفاوت باشد، ولی شباهت زیاد شرایط اقلیمی مناطق جاسک و کهورستان لزوم بازبینی و تکرار مطالعه در منطقه کهورستان را ضروری می سازد. حنفی بجد و همکاران در شهرستان حاجی آباد دو گونه *Meriones persicus* و *Tatera indica* را گزارش نمودند که دو گونه غالب صید شده در مطالعه حاضر هم بوده اند ولی در هیچیک از نمونههای صید شده این محققین آلودگی لیشمانیایی دیده نشد (۳۴).

در این مطالعه در سه جونده *Tatera indica*، *Meriones hurrianae* و *Gerbillus nanus* آلودگی لیشمانیایی با هر دو روش میکروسکپیک و مولکولی مشاهده گردید. در گونه *T. indica* در هر دو روش تشخیصی فقط یک مورد آلودگی به لیشمانیا مازور مشاهده شد. در گونه *M. hurrianae* یک مورد آلودگی به روش میکروسکپیک در یک نمونه ماده و دو مورد آلودگی در دو نمونه ماده بروش PCR اختصاصی اثبات گردید. در گونه *G. nanus* نیز در روش میکروسکپیک یک مورد آلودگی لیشمانیایی در یک نمونه نر و در روش مولکولی علاوه بر آن نمونه، یک مورد آلودگی نیز در یک نمونه ماده مشاهده و ثبت گردید. شایان ذکر است که روش میکروسکپیک صرفاً با بررسی لامهای تهیه شده از گوش جوندگان انجام ولی روش مولکولی هم بر روی لامهای پوستی مثبت و هم نمونههای کبد و طحال انجام گردید. لذا روش مولکولی قادر بود دو نمونه ای که لامهای تهیه شده از گوششان بروش میکروسکپیک منفی اعلام شده بود را مثبت تشخیص دهد که این مسأله حساسیت بیشتر روش مولکولی را در تشخیص انگل نشان می دهد.

آلودگی ژریل هندی (*T. indica*) به لیشمانیا مازور در مطالعات متعددی بخصوص در مناطق غربی و جنوب

جونندگان جنس *Gerbillus spp.* را آلوده به لیشمانیا مازور در منطقه لارستان استان فارس گزارش نمودند. آنها گونه این جونده را ذکر نمودند ولی بر اساس اندازه نمونه‌ها (دو مورد آلودگی) که بزرگ بوده‌اند، قطعاً این دو نمونه از گونه نانوس نبوده‌اند (۲۱). البته در کشورهای حوزه خاورمیانه از جمله مصر، اردن و فلسطین اشغالی مواردی از آلودگی گونه‌هایی از جنس ژریلوس از جمله *Gerbillus pyramidum* و *Gerbillus dasyurus* به ل. مازور گزارش شده است ولی هیچیک از این گزارشات در مورد گونه نانوس نبوده است (۳۸ و ۳۷).

در این مطالعه آلودگی سه گونه جونده ذکر شده فوق با هر دو روش میکروسکوپی و PCR اختصاصی مشاهده گردید. روش مولکولی در تشخیص آلودگی موفق‌تر عمل نمود بطوریکه روش میکروسکوپی ۳ مورد آلودگی و روش مولکولی ۵ مورد آلودگی را مشخص نمود. از آنجا که در روش PCR، DNA انگل مورد جستجو قرار می‌گیرد و اختصاصیت و حساسیت آنهم بسیار بالاست، انتظار هم می‌رفت که قدرت تشخیصی آن نسبت به روش میکروسکوپی که بسیار وابسته به مهارت و قدرت تشخیص فرد میکروسکوپیست می‌باشد، بالاتر باشد. این مسأله در مطالعات سایر محققین نیز مورد تأکید قرار گرفته است (۲۹ و ۱۹).

مطالعه حاضر اولین مطالعه با استفاده از روش مولکولی PCR برای تعیین مخازن بیماری لیشمانیوز پوستی در استان هرمزگان بوده است و برای اولین بار در این منطقه از کشور انگل لیشمانیا مازور از جونندگان ژریلیده شناسایی شده است. آلودگی هر سه گونه جونده *G. M. hurrianae* و *T. indica, nanus* به لیشمانیا مازور برای اولین بار در این استان گزارش می‌گردد. آلودگی

غربی کشور گزارش شده است. جوادیان و همکاران این گونه را بعنوان میزبان مخزن اصلی سالک نوع مرطوب در استانهای ایلام و خوزستان گزارش نموده‌اند (۱۸). در این مناطق گونه‌های *Nesokia indica* و *Meriones lybicus* بعنوان مخازن ثانویه بیماری مطرح هستند. عسکری و همکاران اینگونه را بعنوان مخزن ل. مازور در منطقه خرامه شیراز گزارش نمودند (۱۹). مهربانی و همکاران نیز در شهرستان لارستان استان فارس که در همسایگی استان هرمزگان قرار گرفته است، با روشهای میکروسکوپی و مولکولی آلودگی همین گونه را گزارش نمودند (۲۱).

گونه جرد هندی صحرائی، *Meriones hurrianae* مخزن اصلی سالک روستایی در جنوب شرقی کشور محسوب می‌گردد، جایکه معمولاً تاترا ایندیکا بعنوان مخزن ثانویه عمل می‌نماید (۲۰). مجبعلی و همکاران آلودگی این گونه به ل. مازور را به روشهای میکروسکوپی، ایزوآنزیمی و RAPD-PCR در جنوب شرقی کشور شامل جنوب بلوچستان و مناطق دشتیاری، کنارک و چابهار گزارش نمودند (۳۵). آلودگی این گونه در کشور ایران محدود به جنوب شرقی کشور بوده است و در مطالعه حاضر نیز آلودگی در مناطق همجوار استان سیستان و بلوچستان گزارش می‌گردد. گونه مریونس هوریانه در استان راجستان هندوستان نیز به لیشمانیا مازور آلوده گزارش شده است (۳۶).

بر اساس تحقیقات گسترده نویسندگان، آلودگی ژریل بلوچستان *Gerbillus nanus* به انگل لیشمانیا مازور تاکنون در هیچ منبع علمی ذکر نشده و بنظر می‌رسد آلودگی این گونه به انگل لیشمانیا در این تحقیق برای اولین بار در سطح دنیا می‌باشد. مهربانی و همکاران برای اولین بار بروش میکروسکوپی و مولکولی دو نمونه از

گونه ژریلیوس نانوس به لیشمانیا ماژور برای اولین بار در سطح دنیا گزارش می‌شود.

نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های این تحقیق، بیماری سالک در این کانون نوظهور، از نوع روستایی یا مرطوب با عامل لیشمانیا ماژور می‌باشد و سه گونه چونده تاترا ایندیکا، مریونس هوریانه و ژریلیوس نانوس بعنوان میزبانان مخزن بیماری معرفی می‌گردند که بنظر می‌رسد هر سه گونه بعنوان میزبانان فعال بیماری در منطقه عمل می‌نمایند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق بر اساس طرح تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان و با شماره ۲۵۱/پ/م مورخ شیراز انجام شده است.

References

1. Etemad A. Mammals of Iran. 1st ed. National Association of Natural Resources Protection Press, Tehran. 1978. p. 133-156 [in Persian].
2. Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 2000; 30: 1269-81.
3. WHO: Report of the scientific working group on Leishmaniasis. Geneva; Meeting Report, 2-4 Feb. 2004. Available from <http://apps.who.int/tdr/svc/publications/tdr-research-publications/swg-report-leishmaniasis>.
4. Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res* 2006; 123: 311-330.
5. Nadim A, Faghieh M. The epidemiology of cutaneous leishmaniasis in the Isfahan province of Iran. I. The reservoir. I. The human disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1968; 61: 534-542.
6. Killick-Kendrick R. The life cycle of Leishmaniasis in the sand fly with special reference to the form infective to vertebrate host. *Ann Parasitol Hum Comp* 1990; 65: 37-42.
7. Mohebbi M. Zoonotic protozoa diseases. 1st ed, Tehran: Nadi Press. 1996. p. 74-74 [in Persian].
8. Ashford RW, Bettini S. Leishmaniasis. *Ecology & Epidemiology: Old World*. In: Peters, W., Killick-Kendrick, R (Eds). *The leishmaniasis in biology & medicine*. London: Academic press. 1987. p. 366-424.
9. Seyedi-Rashti MA, Nadim A. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Iran. Khorassan area, Part I: the reservoirs. *Bul Soci Pathol Exotique* 1967; 60: 510-518.
10. Seyedi-Rashti MA, Salehzadeh A. A new focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis near Tehran, Iran. *Bul Soci Franca Parasitol* 1990; 8, Supplement 2: 1145 (Abstract).
11. Rassi Y, Sofizadeh A, Abai MR, Oshagh MA, Rafizadeh S, Mohebbi M and et al. Molecular detection of *Leishmania major* in the vectors and reservoir hosts of cutaneous Leishmaniasis in Kalaleh district, Golestan Province, Iran. *Iran J Arth-Borne Dis* 2008; 2: 21-27.
12. Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA, Mohebbi M. *Meriones libycus* and *Rhombomys opimus* (Rodentia: Gerbillidae) are the main reservoir hosts in a new focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90: 503-504.

13. Rassi Y, Jalali M, Javadian E, Moatezedian MH. Confirmation of *Meriones libycus* (Rodentia: Gerbillidae) as the main reservoir host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Arsanjan, Fars province, south of Iran (1999-2000). *Iran J Publ Health* 2001; 30: 143-144.
14. Rassi Y, Qasemi M, Javadian E, Motazedian MH, Rafizadeh S, Aghayee-Afshar A and et al. Determination of reservoir(s) and vector(s) of cutaneous leishmaniasis by Nested-PCR in Marvdasht district, Fars province, southern Iran. *Kerman Journal of Medical Sciences* 2007; 14: 134-139.
15. Momenbellah-fard, Kalantari M, Rassi Y, Javadian E. The PCR-based detection of *Leishmania* major infections in *Meriones libycus* (Rodentia: Muridae) from southern Iran. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; 97: 811-816.
16. Pourmohammadi B, Motazedian MH, Kalantari M. Rodent infection with *Leishmania* in a new focus of human cutaneous leishmaniasis, in northern Iran. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 2008; 102: 127-133.
17. Yaghoobi Ershadi MR, Hanafi-Bojd AA, Akhavan AA, Zahrai-Ramazani AR, Mohebbali M. Epidemiological study in a new focus of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major* in Ardestan town, central Iran. *Acta. Trop* 2001; 79: 115-121.
18. Javadian E, Dehestani M, Nadim M, Rassi Y, Tahvildari-Bidruni C, Seyedi-rashtyi MA, and et al. Confirmation of *Tatera indica* (Rodentia: Gerbillidae) as the main reservoir host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in the west of Iran. *Iranian J Publ Health* 1998; 27: 55-60.
19. Asgari Q, Motazedian MH, Mehrabani D, Oryan A, Hatam GR, Owji SM, and et al. Zoonotic Leishmaniasis in Shiraz, southern Iran: A molecular, isoenzyme and morphologic approach. *Journal of Research in Medical Sciences* 2006; 12: 7-15.
20. Seyedi-Rashti MA, Nadim A. Cutaneous leishmaniosis in Baluchistan Iran. Abstract and Poster, Volume XI, International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Calgary, Canada, 16-22 September, P: 124.1984.
21. Mehrabani D, Motazedian MH, Oryan A, Asgari Q, Hatam GR, Karamian M. A search for the hosts of *Leishmania major* in the Larestan region of southern Iran: demonstration of the parasite in *Tatera indica* and *Gerbillus* sp., by microscopy, culture and PCR. *Ann Trop Med Parasitol* 2007; 101: 315-322.
22. Hajjaran H, Mohebbali M, Alimoradi S, Abaei MR, Edrissian GH. Isolation and characterization of pathogenic *Leishmania turanica* from *Nesokia indica* (Rodentia: Muridae) by PCR-RFLP and ITS1 sequencing in Iran. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 2009; 103: 1177-1179.
23. Javadian E, Nadim A, Tahvildari-Bidruni G, Assefi V. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Iran, B. Khorasan, Part v, Report on focus of zoonotic leishmaniasis in Esfarayen. *Bull Soc Path Exot* 1976; 69: 140-143.
24. Yaghoobi-ershadi MR, Akhavan AA, Zahraei-Ramazani AR, Jalali-Zand AR, Piazak N. Bionomics of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. *J Vector Ecol* 2004; 30: 115-118.
25. Yaghoobi-ershadi MR, Javadian E, Tahvildari-Bidruni GH. The isolation of *Leishmania major* from *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) *caucasicus*, in Isfahan province, Islamic Republic of Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88: 518-519.
26. Azizi K, Rassi Y, Momenbellah-Fard MD. PCR-based detection of *Leishmania major* kDNA within naturally infected *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae); the vector of cutaneous leishmaniasis, Southern Iran. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 2010; 104 : 440-442.
27. Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sandflies by seminested PCR on minicircle kinetoplast DNA. *Applied and Environmental Microbiology* 2000; 66: 1933-1938.
28. Azizi K, Rassi Y, Javadian E, Motazedian MH, Asgari Q, Yaghoobi-Ershdi MR. First detection of *leishmania infantum* in *Phlebotomus* (*Larrousius*) *major* from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Fars province, south of Iran. *J Med Entomol* 2008; 45: 726-731.
29. Alvar J, Barker JR. Molecular tools for epidemiological studies and diagnosis of leishmaniasis and selected other parasitic diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96 : S243-250.

30. Edrissian GH, Zovein Z, Nadim A. A simple technique for preparation of smears from the ear of *Rhombomys opimus* for the detection of *Leishmania* infection. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1982; 76: 706-707.
31. Motazedian M H, Karamian M, Noyes HA, Ardehali S. DNA extraction and amplification of *Leishmania* from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. *Ann Trop Med Parasitol* 2002; 96: 31-34.
32. Rassi Y, Azizi K, Motazedian MH, Rafizadeh S, Fakhar M & Hatam GR. The seminested PCR based detection of *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in a new endemic focus of visceral leishmaniasis in Iran. *Iranian J Arthropod-Borne Dis* 2007; 1: 38-42.
33. Soleimani-Ahmadi M, Javadian E, Reisi A, Yaghoobi-Ershadi MR. Study on entomology fauna of psychodidae in Kahurestan area, Bandar Abbas. *Hormozgan Medical Sciences Journal* 1998; 2: 25-30.
34. Hanafi-Bojd AA, Yaghoobi-Ershadi MR, Zamani Q, Barzehkar A, Jaafari R, Pourabazari GR. Epidemiological aspects of cutaneous leishmaniasis in Hajiabad county, Hormozgan province 2003. *Hormozgan Medical Sciences Journal* 2006; 10: 63-70.
35. Mohebali M, Javadian E, Yaghoobi-Ershadi MR, Akhavan AA, Hajjarian H, Abaei MR. Characterization of *Leishmania* infection in rodents from endemic areas of the Islamic Republic of Iran. *East Med Health J* 2004; 10: 591- 598.
36. Morsy TA, Shoukry A, Schnur LF, Sulitzeanu A. *Gerbillus pyramidum* is a host of *Leishmania* major in the Sinai peninsula. *Ann Trop Med Parasitol* 1987; 81: 741-742.
37. Peters W. The identity of some stocks of *Leishmania* isolated in India. *Ann Trop Med Hyg* 1981; 75: 247-249.
38. Wesserberg G, Abramsky Z, Anders G, El Fari M, Schoenian G, Schnur L, and et al. The ecology of cutaneous leishmaniasis in Nizzana, Israel: infection patterns in the reservoir host and epidemiological implications. *Int J Parasitol* 2002; 32: 133-143.